

Método de extração de DNA nos estudos de microbiologia ruminal



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Leite
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

DOCUMENTOS 214

Método de extração de DNA nos estudos de microbiologia ruminal

Autores

*Shirley Motta de Souza
Ellen de Almeida Moreira
Luiz Gustavo Ribeiro Pereira
Thierry Ribeiro Tomich
Fernanda Samarini Machado
Mariana Magalhães Campos
Jailton da Costa Carneiro
Marlice Teixeira Ribeiro
Junior Cesar Fernandes Lima
Pedro Braga Arcuri*

***Embrapa Gado de Leite
Juiz de Fora, MG
2018***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Leite
Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Dom
Bosco
CEP: 36038-330 – Juiz de Fora/MG
Telefone: (32)3311-7400
Fax: (32)3311-7424
<http://www.embrapa.br>
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações da Unidade
Responsável

Presidente
Pedro Braga Arcuri

Secretária-Executiva
Inês Maria Rodrigues

Membros
*Jackson Silva e Oliveira, Leônidas Paixão
Passos, Alexander Machado Aua, Fernando
Cesár Ferraz Lopes, Francisco José da Silva
Lédo, Pérsio Sandir D'Oliveira, Fábio Homero
Diniz, Frank Ângelo Tomita Bruneli, Nívea
Maria Vicentini, Leticia Caldas Mendonça, Rita
de Cássia Bastos de Souza, Rita de Cássia
Palmyra da Costa Pinto, Virgínia de Souza
Columbiano Barbosa*

Supervisão editorial
Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

Normalização bibliográfica
Inês Maria Rodrigues

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Tratamento das ilustrações e editoração
eletrônica
Carlos Alberto Medeiros de Moura

Arte da Capa
Adriana Barros Guimarães

1ª edição
On-line (2018)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Gado de Leite

Método de extração de DNA nos estudos de microbiologia ruminal / Shirley
Motta de Souza ... [et al.]. – Juiz de Fora : Embrapa Gado de Leite, 2018.
31 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 214).

ISSN 1516-7453

1. Extração de DNA ruminal. 2. Ribonuclease A. 3. Protocolo de extração.
I. Souza, Shirley Motta de. II. Moreira, Ellen de Almeida. III. Pereira, Luiz
Gustavo Ribeiro. IV. Tomich, Thierry Ribeiro. V. Machado, Fernanda Samarini.
VI. Campos, Mariana Magalhães. VII. Carneiro, Jailton da Costa. VIII. Ribeiro,
Marlice Teixeira. IX. Lima, Junior Cesar Fernandes. X. Arcuri, Pedro Braga.
XI. Série.

CDD 636.085

© Embrapa, 2018

Autores

Shirley Motta de Souza

Zootecnista, D.Sc., bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes

Ellen de Almeida Moreira

Biomédica, M.Sc., bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – Fapesb

Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

Médico-veterinário, D.Sc., em Ciência Animal, pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Thierry Ribeiro Tomich

Médico-veterinário, D.Sc., em Ciência Animal, pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Fernanda Samarini Machado

Médica-veterinária, D.Sc., em Nutrição Animal, pesquisadora da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Mariana Magalhães Campos

Médica-veterinária, D.Sc., em Nutrição Animal, pesquisadora da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Jailton da Costa Carneiro

Zootecnista, D.Sc., em Ciência Animal, pesquisador da
Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Marlice Teixeira Ribeiro

Farmacêutica Bioquímica, M.Sc., em Microbiologia Veterinária,
analista da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Junior César Fernandes Lima

Químico, Esp., em Microbiologia do Rúmen, analista da
Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Pedro Braga Arcuri

Engenheiro-agrônomo, Ph.D, em Ciência Animal, pesquisador
da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Apresentação

As vacas não são capazes de produzir leite de modo autônomo. Precisam de ajuda. No rúmen, a simbiose formada com as bactérias, protozoários, fungos, vírus e micoplasmas viabilizam a utilização de diferentes alimentos como, por exemplo, forragens tropicais, que de outra forma não poderiam ser transformados em leite. Todo e qualquer processo produtivo que busque otimização de desempenho baseia-se no entendimento da transformação de inputs em *outputs*. Isso é regra. Portanto, entender como se dá o processo de interação no rúmen é de importância estratégica para que se atinja uma contínua melhoria do desempenho animal. Além de entender, disseminar o conhecimento de metodologias que permitam a outros também entender como se dá o processo de conversão do alimento ingerido pela vaca em leite, é iniciativa que merece ser enaltecida!

O estudo da microbiota ruminal evoluiu rapidamente após a introdução de metodologias para o estudo das diferentes populações, a partir do sequenciamento e interpretação do material genético de diferentes microrganismos e suas quantidades relativas. Como resultado evolutivo, tem sido possível enriquecer a interpretação do desempenho dos animais associando informações complementares às dos indicadores zootécnicos tradicionais. Para a cadeia produtiva isso traz ganhos claros e materializáveis, pois a produção leiteira pode se valer de dietas e procedimentos de manejo que viabilizem a otimização do funcionamento da microbiota, com o objetivo de otimizar o desempenho animal.

Nesta presente obra, resultante de esforço coletivo e colaborativo, a Embrapa Gado de Leite oferece à comunidade científica e acadêmica acesso sistematizado a conhecimentos e procedimentos de grande importância e que contribuirão para promover incrementos na produtividade e na redução do impacto ambiental da atividade leiteira tropical. Mais que isso, esta obra renova o compromisso da Embrapa Gado de Leite de continuar atuando em parceria com todos os agentes públicos e privados que estejam focados na busca da produção de leite saudável, ambientalmente sustentável e socialmente justo, cumprindo sua função de vetor de desenvolvimento humano, em toda a sua plenitude.

Convido você a conhecer esta publicação e a interagir com seus autores!

Paulo do Carmo Martins
Chefe-geral da Embrapa Gado de Leite

Sumário

Introdução.....	9
Principais Métodos Utilizados para Extração de DNA Ruminal.....	11
Protocolo de Extração de DNA.....	12
Reagentes necessários.....	13
Procedimentos de extração do DNA da fração sólida e líquida do conteúdo ruminal.....	14
Tratamento do DNA com ribonuclease A (RNase A).....	24
Quantificação do DNA na solução de extração.....	27
Considerações Finais.....	28
Referências	29



Introdução

O ecossistema ruminal é um ambiente filogeneticamente complexo (FLINT et al., 2008) onde vivem em simbiose com o hospedeiro, aproximadamente, 10¹¹ células por grama de conteúdo ruminal e, esses microrganismos, contemplam diferentes espécies e gênero de bactérias, archaeas, fungos, protozoários e vírus, conferindo aos ruminantes a capacidade de digerir material vegetal (ARCURI et al., 2011).

A fermentação ruminal resulta de relações ecológicas complexas entre as diferentes espécies de microrganismos ruminais e a estrutura da comunidade microbiana pode ser afetada pelas características do hospedeiro e dos alimentos que compõem a dieta (WEIMER, 2011). Assim, um melhor conhecimento sobre a composição e função da microbiota do rúmen pode ajudar no desenvolvimento de estratégias para melhorar a eficiência do holobionte, reduzindo assim os impactos gerados ao meio ambiente, uma vez que, melhorando-se o desempenho animal, resulta em menor consumo de recursos naturais e também em uma maior eficiência do sistema digestivo (ZHOU et al., 2010), possibilitando redução na produção de dejetos e na emissão de metano entérico dos ruminantes.

No Brasil, estudos que empregam metodologias de caracterização molecular e métodos independentes de cultivo para o estudo da diversidade genética de comunidades microbianas do rúmen são ainda escassos. Porém, o interesse pela caracterização dos microrganismos ruminais têm crescido nos últimos anos, já que representam papel crucial na regulação e funcionamento do ecossistema ruminal. Além disso, esses microrganismos podem apresentar valores biotecnológicos e econômicos, representando fonte de produtos farmacêuticos, enzimas e ácidos orgânicos (OLIVEIRA et al., 2009).

As limitações dos métodos tradicionais, aliado ao avanço tecnológico na área de biologia molecular têm permitido o desenvolvimento de estudos do ambiente ruminal com detalhamento sem precedentes, revolucionando o entendimento da microbiota ruminal e a descoberta de microrganismos não-cultiváveis. Entretanto, variações na amostragem, preservação da amostra

e dos métodos de extração de DNA induzem a incertezas sobre a influência dessas técnicas na estrutura da comunidade microbiana e pode ocasionar viés nos resultados (FLIEGEROVA et al., 2013).

O primeiro passo para os estudos que utilizam técnicas moleculares é a obtenção do material genético. Para o presente método, será considerada a extração do DNA metagenômico, ou seja, uma amostra representativa de toda a população microbiana ruminal. A obtenção do DNA em quantidade e qualidade é uma etapa crítica, já que o método de extração e a distribuição dos microrganismos em nichos ecológicos como, por exemplo, na fração sólida e/ou líquida do rúmen são fatores que interferem na análise da diversidade microbiana, pois os habitantes do rúmen são altamente diversificados e nem todo método de extração funciona igualmente para os diferentes grupos microbianos (HENDERSON et al., 2013).

A técnica de amostragem do conteúdo ruminal é outra fonte de variação e podem ser observadas diferenças, caso o material seja amostrado via sonda esofágica, cânula ruminal ou no abate. Além da amostragem, segundo Pitta et al. (2010), o fracionamento da amostra entre líquido e sólido também podem impactar os parâmetros da comunidade ruminal. A temperatura de congelamento de amostras do conteúdo ruminal também é um fator importante, os estudos indicam como sendo ideal a temperatura de -80 °C (FLIEGEROVA et al., 2013) e, é conhecido que bactérias gram negativas, predominantes no rúmen são particularmente sensíveis ao congelamento e descongelamento (HAMMOND et al., 1992), ainda que Prates et al. (2010) tenham indicado que a biodiversidade do fluido ruminal não tenha sido substancialmente alterada devido ao congelamento. Portanto, nesse caso tem sido recomendado o uso do glicerol como crioprotetor para minimizar o dano celular e manter a viabilidade após o congelamento (MALIK, 1991; PERRY, 1998).

A escolha do método de extração é de fundamental importância (VILLEGAS-RIVERA et al., 2013) e, é necessário que haja uma maior discussão por parte da comunidade científica visando a busca por padronização, o que irá possibilitar a comparação dos resultados obtidos, melhorando a compreensão do ecossistema ruminal, assim como maior entendimento das relações entre os componentes dessa complexa comunidade, hospedeiro e dieta.

O objetivo foi apresentar os métodos de extração de DNA ruminal e descrever o protocolo metodológico adotado no projeto RumenGases (01.10.06.001.03.00 SEG, 02.11.05.008.00.00) desenvolvido na Embrapa Gado de Leite no período de abril de 2011 a julho de 2016.

Principais Métodos Utilizados para Extração de DNA Ruminal

A escolha do método de extração (Tabela 1) é importante para a obtenção de bons resultados, além de permitir ao pesquisador a comparação com os dados de literatura, facilitando a compreensão da complexa comunidade que é o ambiente ruminal. Porém, outros fatores devem também ser considerados, tais como a qualidade e quantidade do DNA necessário para análises futuras, bem como a disponibilidade de equipamentos, reagentes e kits. É importante destacar que a estrutura da comunidade microbiana obtida a partir de estudos que utilizaram métodos de extração distintos não são necessariamente comparáveis

Estudos recentes ao compararem diversos métodos de extração de DNA têm relatado diferenças significativas na composição da comunidade microbiana ruminal e no rendimento de DNA extraído conforme o método utilizado (BERGMANN et al., 2010; SALONEN et al., 2010). Assim como em outros estudos Henderson et al. (2013) ao avaliaram 15 diferentes métodos de extração de DNA a partir de amostras de conteúdo ruminal de vacas e ovelhas, onde foram avaliados a quantidade, a pureza, a integridade e o tamanho do DNA e a sua capacidade de amplificação por PCR, observaram variação na estrutura da comunidade microbiana e no rendimento de DNA entre os métodos avaliados.

Tabela 1. Principais métodos utilizados na literatura para extração do DNA do conteúdo ruminal.

Método	Referências
Extração do DNA com lise mecânica	KRAUSE et al. (2001)
Extração do DNA com lise química com CTAB buffer	AUSUBEL et al. (1999)
Extração do DNA com lise química com PEXG	JINGHAN (1992)
Extração do DNA com lise química com DNAzol®	CHOMCZYNSKI (1993)
N lauroilsarcosina /lise com proteinase K	BARNS et al., 1994
FastDNA®Spin Kit com buffer TC	Q-BIOgene, MP Biomedicals LLC, Solon, OH, USA http://www.mpbio.com/product.php?pid=116540600&country=223
FastDNA®Spin Kit com buffer Y	Q-BIOgene, MP Biomedicals LLC, Solon, OH, USA http://www.mpbio.com/product.php?pid=116540600&country=223
InstaGene™ matrix	Bio-Rad, Hercules, CA, USA http://www.bio-rad.com/pt-br/product/instagene-matrix
NucleoSpin® método	DRIDI et al. (2009)
Fenol-clorofórmio com repetição do procedimento de lise via <i>bead beater</i>	STEVENSON, WEIMER (2007)
Fenol-clorofórmio com procedimento de lise via <i>bead beater</i>	LUEDERS et al. (2004)
Fenol-clorofórmio com procedimento de lise via <i>bead beater</i> e filtração com kit de purificação	KITTELMANN et al. (2013); RIUS et al. (2012)
PSP®Spin Stool DNA Kit	Invitex GmbH, Berlin, Germany http://www.stratec.com/en/molecular/Products_Molecular/Genomic_DNA/psp_spin_stool_dna_plus_kit/psp_spin_stool_dna_plus_kit.php
QIAamp® DNA Stool Mini Kit	QIAgen, Hilden, Germany https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/qiaamp-dna-stool-mini-kit/#orderinginformation
Procedimento de lise via <i>bead beater</i> com repetição mais coluna de purificação	YU et al. (2004)
ZR Fecal DNA MiniPrep	ZYMO Research Corporation, Orange, CA, USA https://www.zymoresearch.com/microbiomics/dna-isolation/zymbiomics-dna-mini-kit

Protocolo de Extração de DNA

O protocolo metodológico descrito a seguir tem como base as recomendações de Stevenson e Weimer (2007), contemplando o procedimento de lise celular mecânica, através do equipamento “*Mini-Bead Beater 16*” (BioSpec Products®, Bartlesville, OK, USA), ou batedor de esferas, com uso de esferas de zircônio e silício de diâmetro inferior a 0,5 mm e solução de fenol/clorofórmio. O método é aceito universalmente e propicia a extração de DNA de elevada qualidade. Primeiramente, são descritos os reagentes necessários e o passo-a-passo do processo de extração.

Reagentes necessários

- **Tampão de extração (100 mM de Tris/HCl, 10 mM de EDTA, 0,15 M de NaCl pH 8,0)**
 - 2,42 g de Tris/HCl;
 - 1,75 g de NaCl;
 - Pesar o Tris/HCl e o NaCl e dissolver em 100 mL de água ultrapura;
 - Pesar 0,58 g de EDTA e dissolver em 20 mL de água ultrapura;
 - Misturar as duas soluções acima e corrigir o pH para 8,0 com HCl puro;
 - Completar o volume para 200 mL com água ultrapura;
 - Armazenar sob refrigeração.
- **Etanol (70%)**
 - Misturar 30 mL de água ultrapura a 70 mL de álcool puro;
 - Armazenar sob refrigeração.
- **SDS (20%), do inglês sodium dodecyl sulfate**
 - Pesar 5,76 g de SDS;
 - Completar o volume para 100 mL de água ultrapura;
 - Armazenar sob refrigeração.
- **Acetato de sódio (3 M)**
 - Pesar 24,60 g de acetato de sódio;
 - Completar o volume para 100 mL de água ultrapura;
 - Armazenar sob refrigeração.
- **Tampão TE (10 mM de Tris/HCl, 1 mM de EDTA pH 8,0)**
 - Pesar 0,121 g de Tris/HCl e dissolver em 50 mL de água ultrapura;

- Acrescentar 2,0 mL de EDTA – solução estoque 50 mM ;
- Corrigir o pH para 8,0 com HCl;
- Completar o volume para 100 mL com água ultrapura.
- **EDTA (50 mM)**
 - Pesar 1,46 g de EDTA;
 - Completar o volume para 100 mL de água ultrapura;
 - Armazenar sob refrigeração.

Procedimentos de extração do DNA da fração sólida e líquida do conteúdo ruminal

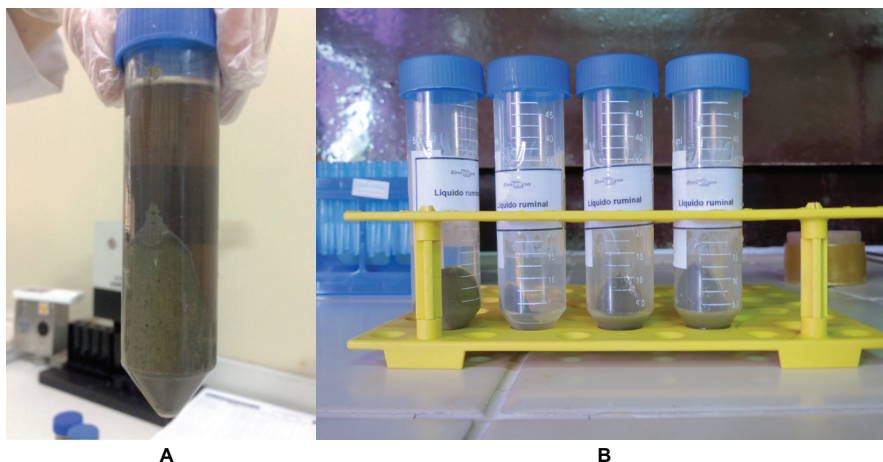
- O conteúdo do rúmen (volumes aproximadamente iguais de sólidos e líquidos totalizando ~ 1,8 L) deve ser firmemente espremido através de quatro camadas de gaze. A porção líquida (aproximadamente 25 mL) deve ser imediatamente colocada em tudo selado e em recipiente com gelo, enquanto a fração sólida (aproximadamente 25 g) é misturado a 75 mL de tampão de extração (TE) e homogeneizado em liquidificador a temperatura baixa (4 °C) por 2 minutos;

OBS.: A quantidade de tampão deve ser ajustada em função do peso da amostra.

- O homogeneizado deve ser transferido para tubos limpos, adicionando-se mais 25 mL do TE resfriado, usado para lavagem do liquidificador;
- Centrifugar a suspensão a 500 x g por 15 minutos a 4 °C para separação das partículas, mantendo as células bacterianas em suspensão;
- O centrifugado deve então ser filtrado em gaze utilizando um funil e novamente transferido para outro tubo de 250 mL;
- O conteúdo retido na gaze deve ser agitado com mais 25 mL do TE e novamente centrifugado e filtrado em gaze no mesmo tubo;

A partir desse ponto, segue-se o protocolo descrito para o conteúdo líquido.

- A porção líquida da amostra do conteúdo ruminal mantida em banho de gelo deve ser adicionada ao centrifugado, em continuidade ao procedimento de extração do DNA total, descrito abaixo;
- Centrifugar o volume da suspensão obtida no procedimento acima a 10.000 x g por 25 minutos a 4 °C (Figura 1);



Fotos: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

Figura 1. (A) Pellet formado após centrifugação; (B) Descarte do sobrenadante.

- Descartar o sobrenadante e ressuspender o centrifugado em vortex juntamente com 4,0 mL de tampão de extração resfriado (Figura 2);

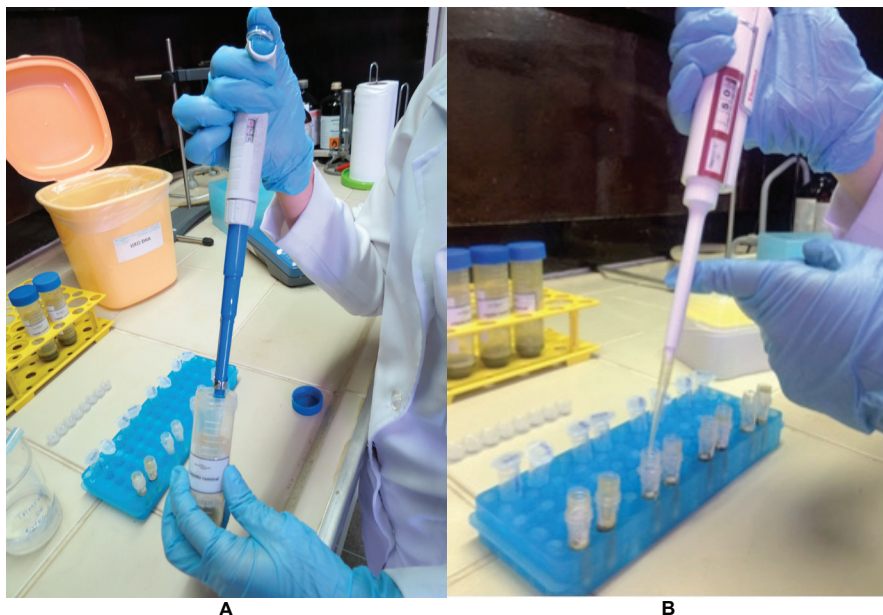


Fotos: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

Figura 2. (A) Ressuspensão do pellet; (B) Agitação do pellet para ressuspensão.

- Transferir em duplicata 700 µL da suspensão de células para tubos de microcentrifuga de 2 mL com tampa de rosca contendo 0,5 g de esferas de zircônio/silica (0,1 mm de diâmetro; Figura 3 A);

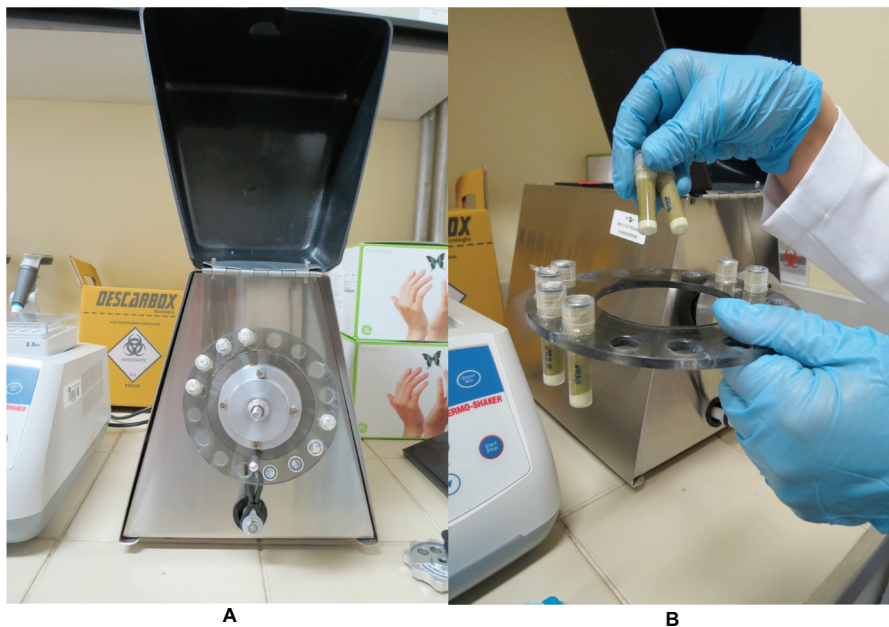
- Ao microtubo adicionar 50 μL de SDS (20%) e 700 μL de fenol equilibrado pH 8,0 (Figura 3 B);



Fotos: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

Figura 3. (A) Transferência da suspensão de células para tubos de microcentrifuga; **(B)** Adição de SDS e Fenol.

- Lise mecânica no *Bead Beater* por 2 minutos de acordo com Weimer et al. (1999; Figura 4);
- Incubar os microtubos em Banho-Maria a 60 °C por 10 minutos;
- Nova lise mecânica no *Bead Beater* por 2 minutos;
- Centrifugar os tubos de microcentrifuga a 12.000 x g por 10 minutos para a separação das fases e retirada do sobrenadante (Figura 5);
- Remover o sobrenadante (600 a 700 μL) e transferir para novos tubos de microcentrifuga de 1,5 mL e adicionar 500 μL de fenol equilibrado pH 8,0. Agitar no vortex por 10 segundos (Figura 6);
- Centrifugar a 12.000 x g por 5 minutos;



Fotos: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

Figura4. (A) Lise mecânica através do *Bead Beater*; **(B)** Após o processo de lise.

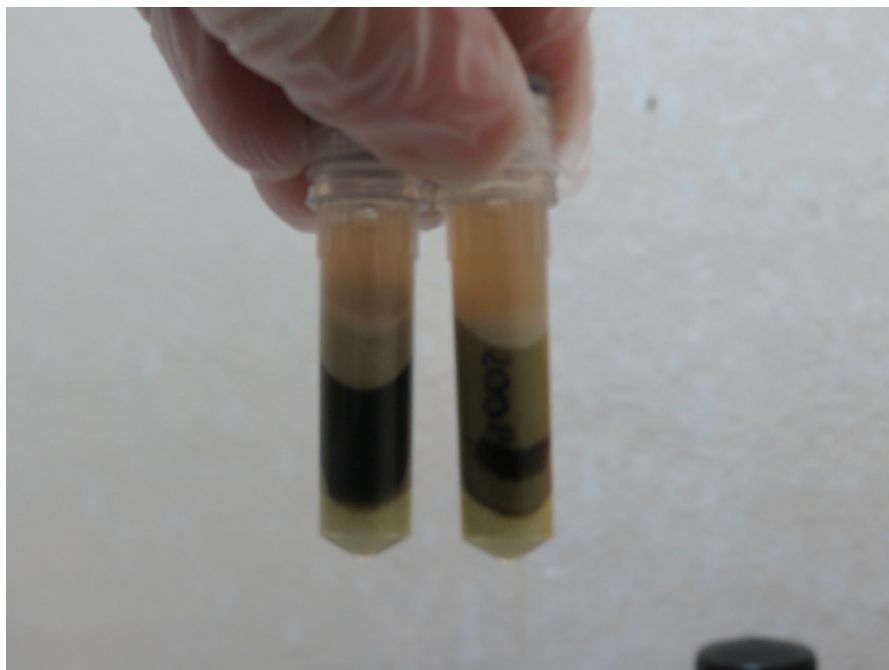
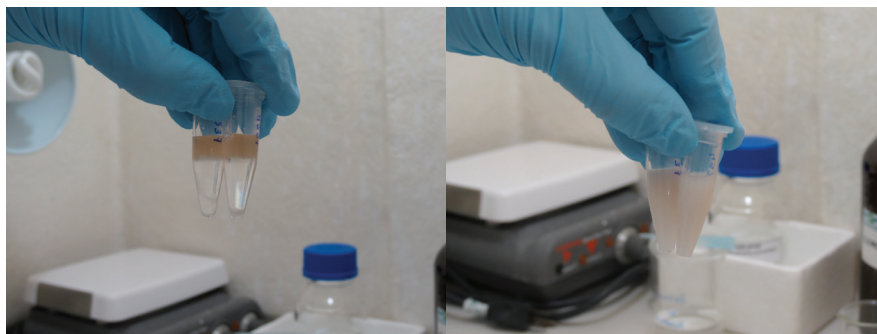


Foto: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

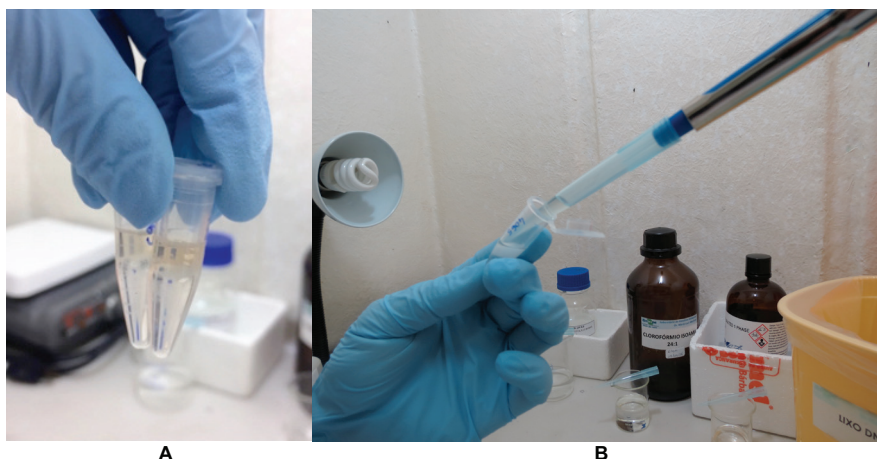
Figura 5. Amostras após o processo de centrifugação com a separação das fases.



Fotos: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

Figura 6. (A) Amostra após centrifugação; (B) amostra após a transferência do sobrenadante e adição de fenol.

- Remover o sobrenadante (cerca de 600 μ L) e transferir para novos tubos de microcentrifuga de 1,5 mL e adicionar 500 μ L de fenol equilibrado pH 8,0. Agitar no vortex por 10 segundos (Figura 7);



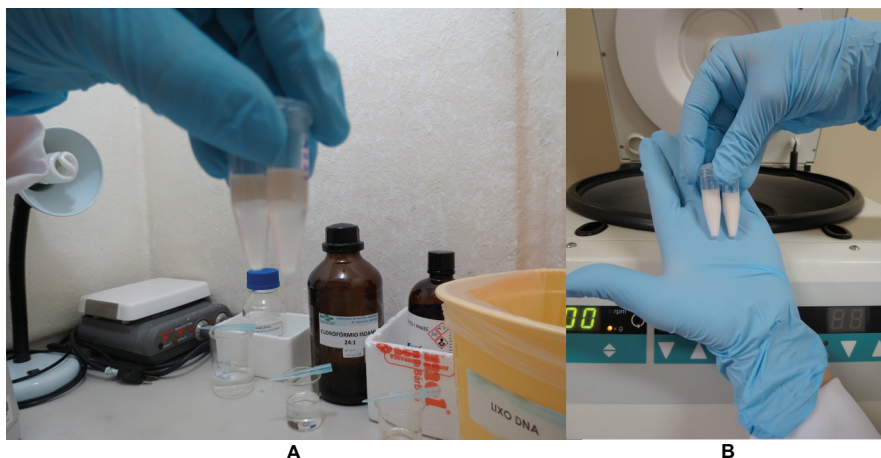
Fotos: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

Figura 7. (A) Amostra após centrifugação; (B) Transferência do sobrenadante.

OBS.: Stevenson e Weimer (2007) recomendaram que o processo de desproteinização com fenol equilibrado seja realizado duas vezes. Porém devido as características das amostras coletadas por sonda esofágica onde há a contaminação com saliva, sugere-se que este procedimento seja repetido mais duas vezes (total de quatro extrações) para melhorar a pureza das amostras.

- Centrifugar a 12.000 x g por 5 minutos;

- Remover o sobrenadante e transferir para novos tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e adicionar 500 μ L de fenol/clorofórmio (1:1). Utilizar o fenol equilibrado pH 8,0. Se o volume de sobrenadante retirado for < 500 μ L, adicionar tampão de extração para manter o volume de sobrenadante retirado entre 450 – 500 μ L. Agitar no vortex por 10 segundos (Figura 8);



Fotos: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

Figura 8. (A) Adição de fenol/clorofórmio (1:1); (B) Homogeneização das amostras.

- Centrifugar a 12.000 x g por 5 minutos;
- Repetir a extração com fenol/clorofórmio (1:1);
- Centrifugar a 12.000 x g por 5 minutos;
- Remover o sobrenadante e transferir para novos tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e adicionar 500 μ L de clorofórmio. Se o volume de sobrenadante retirado for < 500 μ L, adicionar tampão de extração para manter o volume de sobrenadante retirado entre 450 – 500 μ L. Agitar no vortex por 10 segundos (Figura 9);
- Centrifugar a 12.000 x g por 5 minutos;
- Repetir a extração com clorofórmio, adicionando 500 μ L de clorofórmio. Agitar no vortex por 10 segundos.

OBS.: Até esta etapa, procurar manter o volume entre 450 e 500 μ L;

- Centrifugar a 12.000 x g por 5 minutos;

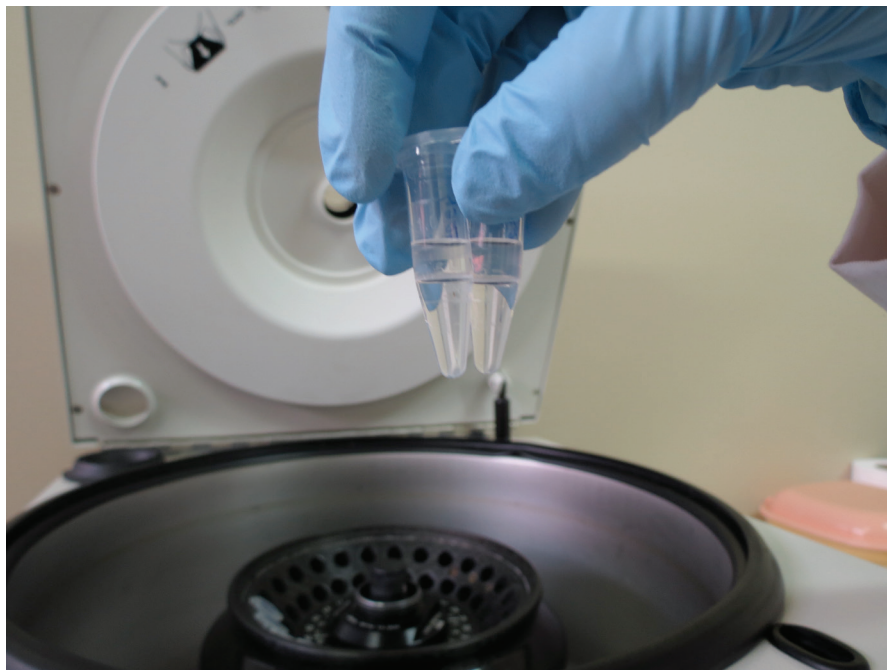


Foto: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

Figura 9. Extração com clorofórmio.

- Remover o sobrenadante (cerca de 450 μ L) e transferir para novos tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. O volume do sobrenadante retirado nesta etapa deve ser conhecido. Ao sobrenadante removido, adicionar 1/10 volume de acetato de sódio (3,0 M) e precipitar com 0,6 volumes de isopropanol. Misturar gentilmente. Não utilizar vortex (Figura 10);
- Em seguida, centrifugar por 5 minutos a 12.000 x g;
- Descartar o sobrenadante e no mesmo microtubo adicionar 1,0 mL de etanol 70% (Figura 11);
- Centrifugar por 5 minutos a 12.000 x g;
- Descartar o sobrenadante e adicionar 500 μ L de etanol puro;
- Centrifugar por 5 minutos a 12.000 x g;
- Descartar o sobrenadante e deixar o centrifugado secar ao ar (20 a 40 minutos; Figura 12);

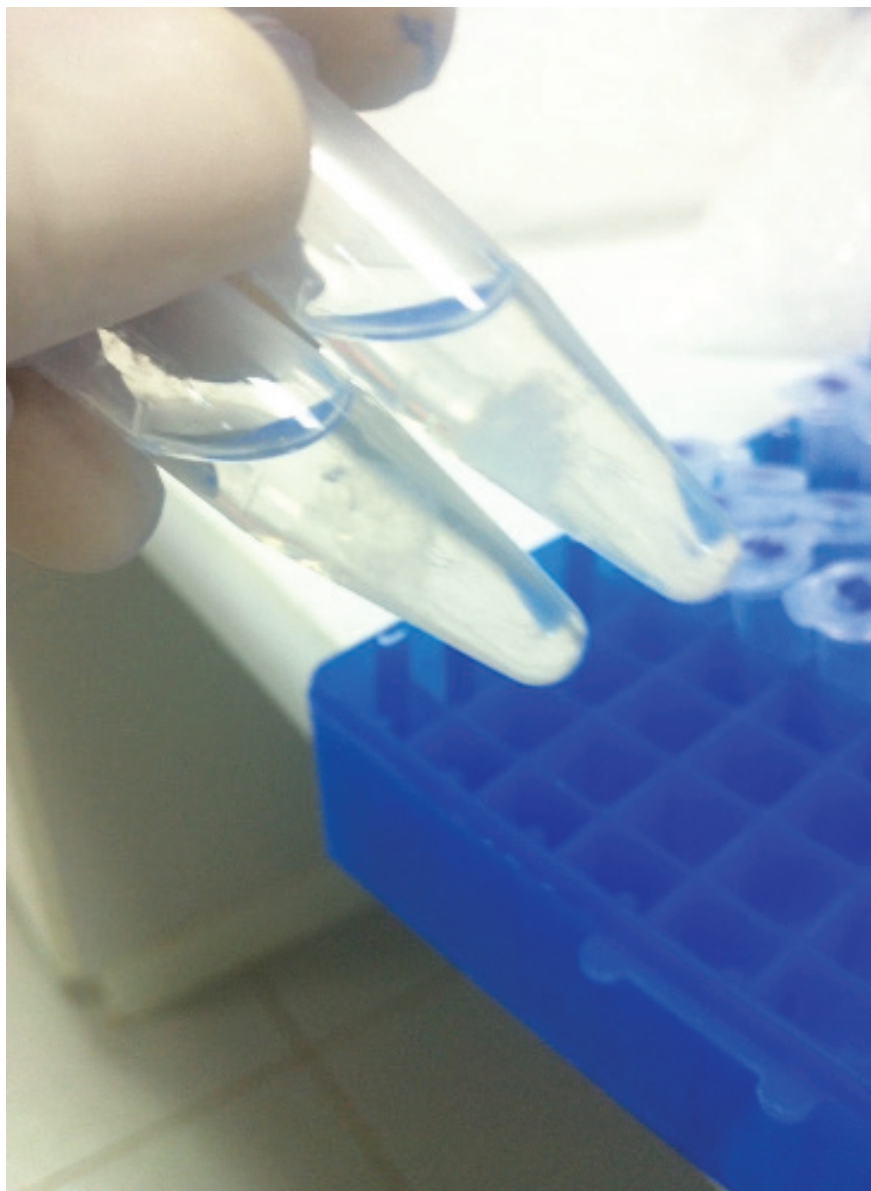


Foto: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

Figura 10. Precipitação do DNA.

- Ressuspender o centrifugado em 50 – 100 μ L de Tampão TE, dependendo do tamanho do *pellet*; (Figura 13);

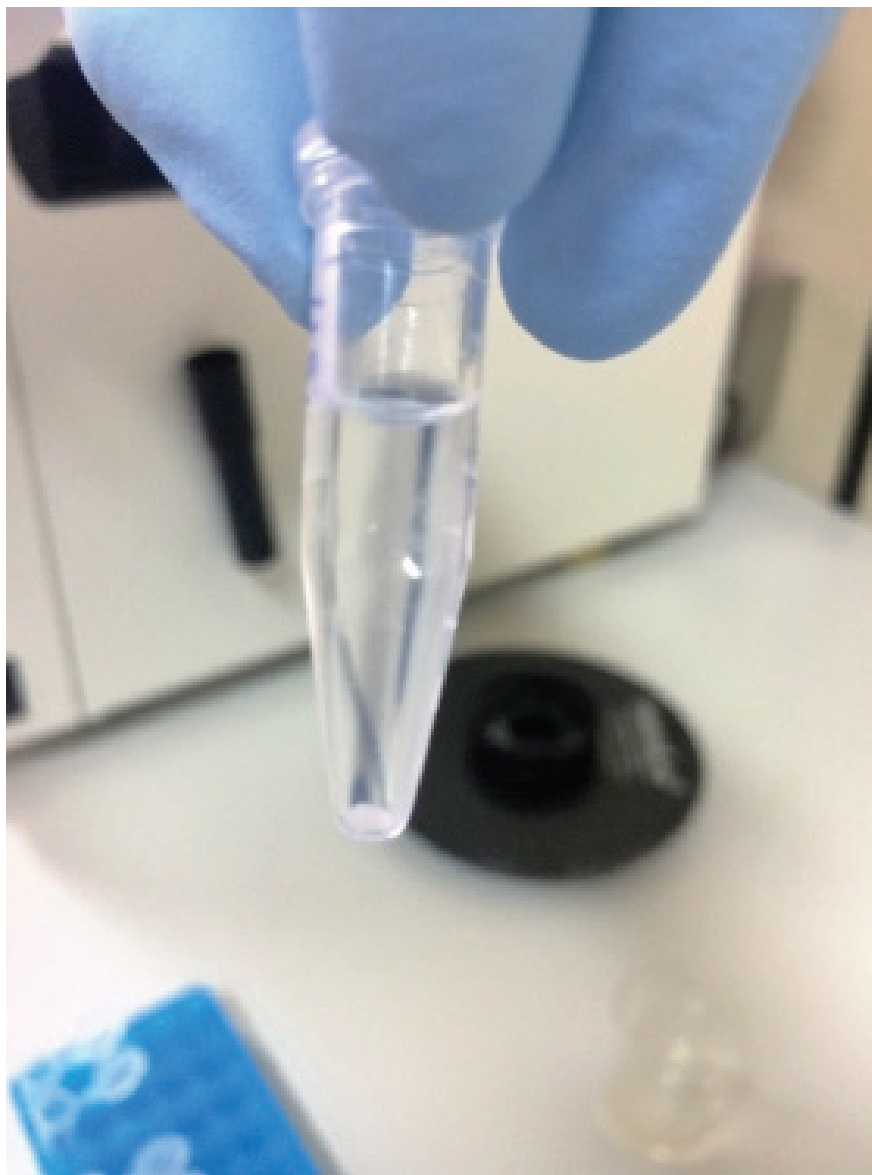


Foto: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

Figura 11. Lavagem do pellet.

- Armazenar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o tratamento com a RNAase;



Foto: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

Figura 12. Secagem do pellet.

OBS.: Todas as etapas do procedimento de extração, assim como todos os reagentes e tubos utilizados na manipulação deverão ser mantidos em banho de gelo durante o procedimento.

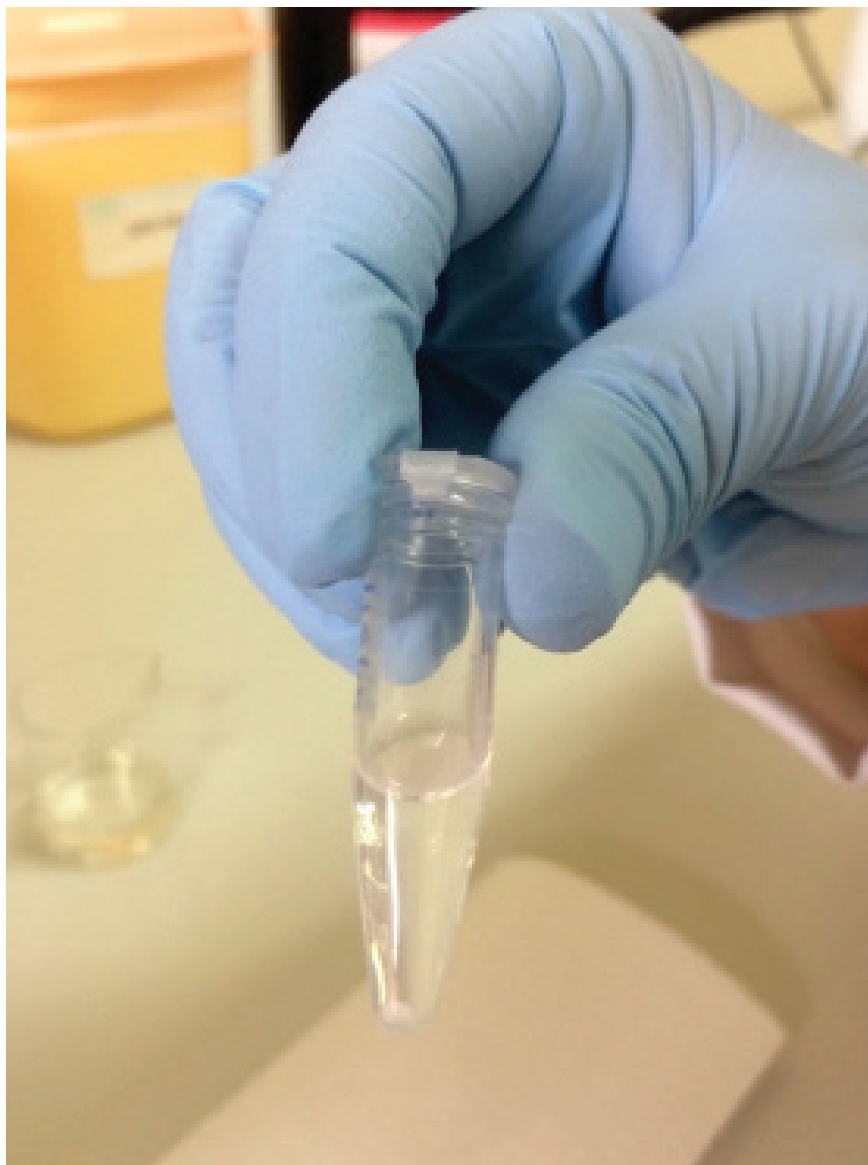


Foto: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

Figura 13. Ressuspensão do pellet.

Tratamento do DNA com ribonuclease A (RNase A)

A Ribonuclease A é uma endoribonuclease que hidrolisa eficientemente RNAs contaminantes em preparações de DNA a partir de culturas de células

bacterianas ou de tecido. A RNase A é uma enzima importante para a remoção de RNA em reações de purificação de DNA, tais como purificação de DNA de plasmídios, DNA metagenômico, remoção de RNA de preparações de proteína recombinante (KALNITSKY et al., 1959).

Para a purificação do DNA metagenômico, após o procedimento de extração as amostras devem ser tratadas com RNase A como descrito:

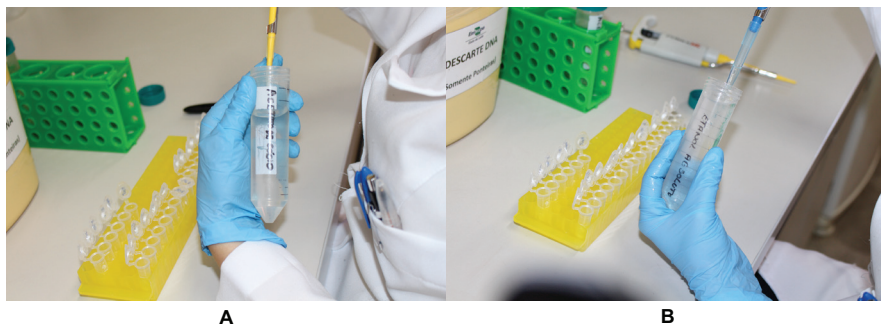
- Antes de começar o procedimento de tratamento de DNA com RNAase A, as réplicas devem ser combinadas em um único tubo, perfazendo um volume de 200 μ L.
- Aos tubos contendo 200 μ L de DNA, adicionar 2,0 μ L de RNAase (10 mg/mL) e misturar gentilmente (Figura 14 A);
- Incubar os tubos em Banho-Maria por 2 horas a 37 °C (Figura 14 B);



Fotos: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

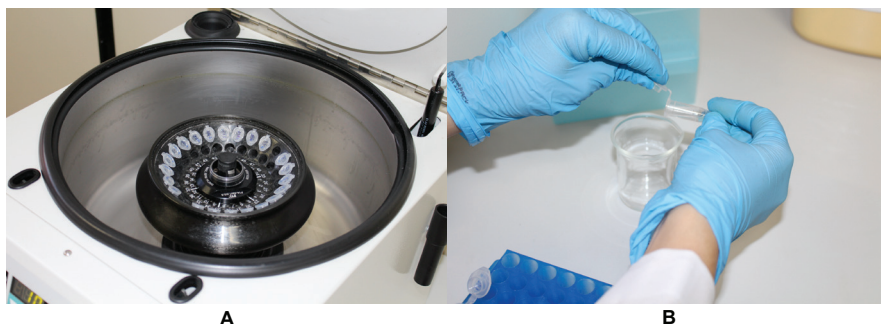
Figura 14. (A) Adição de RNAase Ribonuclease A; (B) Incubação em banho-maria.

- Adicionar 1/10 volume de acetato de sódio (3 M) e 2,5 volumes de etanol 100% (Figura 15). Misturar gentilmente;
- Acondicionar em -80 °C por 2 horas ou *overnight* a -20 °C;
- Centrifugar por 10 minutos a 12.000 x g (Figura 16 A);
- Descartar o sobrenadante e adicionar 1,0 mL de etanol 70%. Não ressuspender o centrifugado (Figura 16 B);
- Centrifugar por 5 minutos a 12.000 x g;



Fotos: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

Figura 15. (A) Adição de acetato de sódio (3 M); **(B)** Adição de etanol 100%.



Fotos: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

Figura 16. (A) Centrifugação das amostras; **(B)** Descarte do sobrenadante.

- Descartar o sobrenadante e deixar o centrifugado secar ao ar (20 a 40 minutos; Figura 17);
- Ressuspender o centrifugado em 100 μ L de Tampão TE (10 mM de Tris/ HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0);
- Centrifugar por 5 minutos a 12.000 x g;
- Armazenar a -80 °C.



Foto: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

Figura 17. Secagem das amostras.

Quantificação do DNA na solução de extração

No sentido de estimar a concentração de DNA, após o tratamento com RNAase A os ácidos nucleicos obtidos são então quantificados e a pureza observada em espectrofotômetro (NanoDrop® 2000-2000c), utilizando-se 2 μ L do DNA diluído em 100 μ L de TE (Figura 18);

As leituras são feitas a 260nm, comprimento de onda correspondente no qual ocorre o pico de absorbância máxima do DNA puro. Assim a leitura da Abs260nm permite o cálculo da concentração dos ácidos nucleicos na amostra. É importante medir também a Abs280nm uma vez que o pico de absorbância máxima das proteínas ocorre para este comprimento de onda, devido especialmente à presença de resíduos de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina).

Para caracterizar a intensidade de contaminação da solução de DNA por proteínas, calcula-se a razão das absorbâncias 260 e 280 nm. Se as proporções determinadas variarem entre 1,8 e 2,0, a solução de DNA é considerada sem contaminação por proteína. Outro valor que reflete as

contaminações por carboidrato, fenol e compostos aromáticos é a razão das absorvâncias 260 e 230 nm, onde as proporções entre 1,5 e 1,8 são consideradas indicativas de DNA puro.



Foto: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

Figura 18. Quantificação e determinação da pureza dos ácidos nucleicos extraídos.

Considerações Finais

A escolha do método de extração de DNA deve basear-se em sua capacidade de manutenção da qualidade do material extraído e disponibilidade de recursos laboratoriais. O protocolo supradescrito, baseado no método de Stevenson e Weimer (2007), possui viabilidade de execução, rendimento de extração e qualidade do DNA extraído, o que o qualifica para utilização em estudos de microbiologia ruminal.

Referências

ARCURI, P. B. et al. Microbiologia do Rumen. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. de. (Ed.). **Nutrição de Ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011.

AUSUBEL, F. M. et al. **Short protocols in molecular biology**. 4. ed. USA: Wiley, 1999.

BARNS, S. M. et al. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 91, p. 1609-1613, 1994.

BERGMANN, I. et al. Influence of DNA isolation on Q-PCR-based quantification of methanogenic Archaea in biogas fermenters. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, p. 78-84, 2010.

CHOMCZNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, v. 15, p. 532-537. 1993.

DRIDI, B. et al. High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanospaera stadtmanae* detected in the human gut using an improved DNA detection protocol. **Plos One**, v. 4, p. e7063, 2009.

FLIEGEROVA, K. et al. Effect of DNA extraction and sample preservation method on rumen bacterial population. **Anaerobe**, v. 29, p. 80-84, 2013.

FLINT, H. J. et al. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 121-131, 2008.

HAMMOND, P. M. **Protein purification**. In: LEDERBERG, J. (Ed.). Encyclopedia of microbiology. San Diego, CA: Academic Press Inc., 1992. v. 3, p. 451-460.

HENDERSON, G. et al. Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. **Plos One**, v. 8, n. 9, p. e74787, 2013.

JINGHAN, A. K. A novel technology for DNA isolation. **Methods in molecular and cellular biology**, v. 3, p. 15-22, 1992.

KITTELMANN, S. et al. Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. **Plos One**, v. 8, p. e47879, 2013.

KALNITSKY, G.; HUMMEL, J. P.; DIERKS, C. Some factors which affect the enzymatic digestion of ribonucleic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 234, n. 1512, 1959.

KRAUSE, D. O.; SMITH, W. J.; McSWEENEY, C. S. Extraction of microbial DNA from rumen contents containing plant tannins. **Biotechniques**, v. 31, p. 294-298, 2001.

LUEDERS, T.; MANEFIELDS, M.; FRIEDRICH, M. W. Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. **Environmental Microbiology**, v. 6, p. 73-78, 2004.

MALIK, K. A. Cryopreservation of bacteria with special reference to anaerobes. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 7, p. 629-632, 1991.

OLIVEIRA, L. G. de; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 742-756, 2009.

PERRY, S. F. Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. **Mol Biotechnol**, v. 9, p. 59-64, 1998.

PITTA, D. W. et al. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. **Microbial Ecology**, v. 59, p. 511-522, 2010.

PRATES, A. et al. Effects of preservation procedures of rumen inoculum on in vitro microbial diversity and fermentation. **Animal Feed Science Technology**, v. 155, p. 186-193, 2010.

RIUS, A. G. et al. Nitrogen metabolism and rumen microbial enumeration in lactating cows with divergent residual feed intake fed high-digestibility pasture. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 5024-5034, 2012.

SALONEN, A. et al. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: Effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, p. 127-134, 2010.

STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. Dominance of Prevotella and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 165-174, 2007.

VILLEGAS-RIVERA, G. et al. Evaluation of DNA extraction methods of rumen microbial populations. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 29, p. 301, 2013.

WEIMER, P. J. End product yields from the extraruminal fermentation of various polysaccharide, protein and nucleic acid components of biofuels feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3254-9, 2011.

WEIMER, P. J. et al. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 122-134, 1999.

YU, Z.; MORRISON, M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. **Biotechniques**, v. 36, p. 808-812, 2004.

ZHOU, M.; HERNANDEZ-SANABRIA, E.; GUAN, L. L. Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 3776-86, 2010.



Gado de Leite

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

